



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

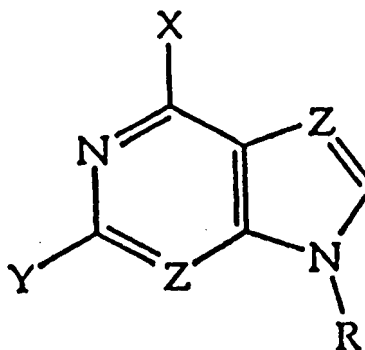
(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C07H 21/00, 19/04, C12Q 1/68</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 95/29184</b> (43) Date de publication internationale: 2 novembre 1995 (02.11.95)
(21) Numéro de la demande internationale: <b>PCT/FR95/00542</b> (22) Date de dépôt international: <b>25 avril 1995 (25.04.95)</b> (30) Données relatives à la priorité: <b>94/05133</b> <b>25 avril 1994 (25.04.94)</b> <b>FR</b> (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): <b>UNIVERSITE LOUIS PASTEUR [FR/FR]; 4, rue Blaise-Pascal, F-67000 Strasbourg (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR).</b> (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): <b>BEHR, Jean-Paul [FR/FR]; 7, rue Eugénie, F-67100 Strasbourg (FR). SCHMID, Nathalie [FR/FR]; 6, rue de Hoerd, F-67300 Schiltigheim (FR).</b> (74) Mandataire: <b>CABINET NUSS; 10, rue Jacques-Kablé, F-67080 Strasbourg Cédex (FR).</b>		(81) Etats désignés: <b>CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b>  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>

(54) Title: POLYCATIONIC NUCLEIC BASES AND OLIGONUCLEOTIDES CONTAINING SAME

(54) Titre: BASES NUCLEIQUES POLYCATIONIQUES ET OLIGONUCLEOTIDES LES CONTENANT

## (57) Abstract

Polycationic nucleic bases and oligonucleotides containing same, particularly C<sub>2</sub> substituted purines, characterised in that they have the structure (a), wherein X is OH or NH<sub>2</sub> (guanine or diaminopurine series), Z is N or CH (purines or deazapurines), and Y is a molecular grouping having affinity for the minor groove of DNA, e.g. distamycin or netropsin derivatives, berenil, Hoechst dye 33258, or a cationic polypeptide such as polylysine, polyarginine, polyornithine, or a polymer such as polyethylene or polypropylene imine.



(a)

## (57) Abrégé

La présente invention a pour objet des bases nucléiques polycationiques et oligonucléotides les contenant, en particulier purines substituées en C<sub>2</sub>, caractérisées en ce qu'elles présentent la structure (a) où X = OH ou NH<sub>2</sub> (séries de la guanine ou de la diaminopurine), où Z = N ou CH (purines ou déazapurines), où Y est un groupement moléculaire ayant une affinité pour le petit sillon de l'ADN, par exemple les dérivés de la distamycine ou de la nétropsine, le bérénil, le colorant Hoechst 33258, ou un polypeptide cationique comme la polylysine, la polyarginine, la polyornithine, ou encore un polymère comme le polyéthylène ou le polypropylène imine.

- 1 -

## Bases nucléiques polycationiques et oligonucléotides les contenant

La présente invention, réalisée au Laboratoire de Chimie Génétique de l'Université Louis Pasteur associé au CNRS (Unité de Recherche Associée U.R.A. D1386 - Faculté de Pharmacie de Strasbourg), concerne des bases nucléiques poly-cationiques, les oligonucléotides les contenant, en particulier les purines substituées en C2, leur procédé de préparation et leur utilisation.

La reconnaissance sélective de séquences d'ADN bicaténaire par des protéines permet la transcription et la transmission de l'information génétique dans tous les systèmes vivants. A l'exception d'une protéine d'initiation dénommée TATA (Kim, J.L. ; Nikolov, D.B. ; Burley, S.K., *Nature* 1993, 365, 520-527), les protéines impliquées dans ces phénomènes reconnaissent une succession de bases nucléiques, essentiellement en établissant avec elles des liaisons hydrogène intermoléculaires dans le grand sillon de la double hélice (Harrison, S.C., *Nature*, 1991, 353, 715-719).

Par interférence spécifique avec des processus d'expression ou de réplication de gènes cellulaires ou d'organismes pathogènes, la reconnaissance de séquences d'ADN par des molécules exogènes peut conduire à de nombreuses applications thérapeutiques. Les biotechnologies pourraient également mettre à profit des molécules capables de "lire" une séquence, par exemple dans le cadre de tests diagnostiques ou pour le séquençage de grands génomes, etc... Plus particulièrement, de telles molécules pourraient trouver leur utilisation en tant qu'outil de recherche en biologie moléculaire, notamment pour la recherche de la présence d'un gène sur le génome, la pratique de la génétique inverse, l'étude du début des sites de transcription, l'étude d'expression, en particulier de protéines sur ADN ou gène reporter, la mutagenèse dirigée, les études sur les animaux transgéniques, ainsi qu'en médecine humaine et vétérinaire, pour le diagnostic sur des ADN normaux ou pathologiques ou pour l'utilisation de l'ADN comme médicament pour la thérapie génique.

D'un point de vue topographique, la liaison d'une molécule à la double hélice et la reconnaissance d'une succession de bases nucléiques peut se faire par formation de ponts hydrogène avec les sites restés vacants dans le petit ou le grand sillon, par intercalation entre les plateaux de paires de bases ou par ouverture locale de l'hélice et liaisons de type Crick et Watson.

Partant de travaux assez anciens sur l'intercalation de composés polycycliques plans présentant une sélectivité diffuse pour les paires de bases GC, d'importants efforts ont été portés depuis une quinzaine d'années sur des

- 2 -

molécules se logeant dans le petit sillon de la double hélice (revue, Zimmer, C. ; Wähnert, U., *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1986, 47, 31-112). Ces composés ont une préférence marquée pour les régions riches en paires de bases AT pour lesquelles le petit sillon est particulièrement étroit, ce qui permet l'établissement de nombreux contacts de Van der Waals entre le substrat et les parois du sillon. Les oligopeptides pyrroliques telles que la nétrospine et la distamycine, qui établissent des ponts hydrogène avec les atomes O<sub>2</sub>(T) et N<sub>3</sub>(A), conduisant ainsi à des affinités de 10<sup>6</sup> à 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> selon la séquence AT particulière, se trouvent parmi les composés les plus sélectifs. Des polypeptides pyrroliques, qui reconnaissent jusqu'à 16 paires de bases AT consécutives ont été synthétisés par homologation, (Youngquist, R.S. ; Dervan, P.B., *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 7564-7566 ; Griffin, J. H. Dervan, P.B., *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 6840-6842).

Récemment des dérivés hémisynthétiques, où certains noyaux pyrroles ont été remplacés par d'autres hétérocycles comme l'imidazole, ont permis de s'affranchir de la monotonie AT et d'introduire le motif GC dans la palette des séquences-cibles ("lexitropsines", Kissinger, K. ; Krowicki, K. ; Dabrowiak, J. C. ; Lown, J. W., *Biochemistry* 1987, 26, 5590-5595 ; Mrksich, M. ; Wade, W.S. ; Dwyer, T. J. ; Geierstanger, B.H. ; Wemmer, D.E. ; Dervan P.B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 7586-7590 ; Geierstanger, B.H. ; Dwyer, T.J. ; Bathini, Y. ; Lown, J.W. ; Wemmer, D.E., *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 4474-4482 ; "microgonotropens" He, G.X. ; Browne, K.A. ; Groppe, J.C. ; Blasko, A. ; Mei, H.Y. ; Bruice, T.C. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 7061-7071 et références citées).

Cependant, dès 1976, A. Rich (Seeman, N.C. ; Rosenberg, J.M. ; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1976, 73, 804-808) avait dit que les quatre bases nucléiques ne pouvaient être distinguées que dans le grand sillon où elles établissent un faisceau de liaisons hydrogène différenciant l'une de l'autre. Par contre, dans le petit sillon, seule la guanine peut donner une liaison hydrogène, les trois autres bases présentant un site accepteur qui ne permet par leur distinction pour une molécule externe.

En 1987, a été décrit simultanément par P. Dervan et C. Helene un mode de reconnaissance de l'ADN (Moser, H.E. ; Dervan, P.B., *Science* 1987, 238, 645-650 ; Le Doan, T. ; Perrouault, L. ; Praseuth, D. ; Habhoub, N. ; Decout, J. ; Thuong, N.T. ; Lhomme, J. ; Helene, C., *Nucleic Acids Res.* 1987, 19, 7749-7760), basé sur la structure de triple hélice (Felsenfeld, G. ; Davies, D. ; Rich, A., *J. Am. Chem. Soc.* 1957, 79, 2023 ; Arnott, S. ; Bond, P.J. ; Selsing, E. ; Smith, P.J.C., *Nucleic Acids Res.* 1976, 3, 2459-2470). Dans ce mode de reconnaissance, un oligonucléotide homopyrimidique de synthèse vient se loger dans le grand

- 3 -

sillon de la double hélice d'ADN, et reconnaît respectivement l'adénine et la guanine d'une séquence homopurique grâce à la formation de triplets de bases isomorphes T-AT et CH<sup>+</sup>-GC. Diverses améliorations récentes sur la nature de la base reconnaissant la guanine ont été décrites, à savoir :

- 5 G-GC (Beal, P.A. ; Dervan, P.B., *Science* 1991, 251, 1360-1363),  
isoC-GC (Ono, A. ; T'so, P.O. ; Kan, L.S., *J. Am. Chem. Soc.* 1991,  
113, 4032-4033),  
8-oxoadenine-GC (Young, S.L. ; Krawczyk, S.H. ; Matteuci, M.D. ;  
Toole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 10023-10027 ; J.J. Jetter, M.C. ;  
10 Hobbs, F.W., *Biochem.* 1993, 32, 3249-3254),  
ou d'autres composés (Koh, J.S. ; Dervan, P.B., *J. Am. Chem. Soc.*  
1992, 114, 1470-1478).

- Ces triplets de bases permettent de s'affranchir des contraintes de pH  
liées à la protonation de la cytosine dans le triplet CH<sup>+</sup>-GC. Néanmoins, les triples  
15 hélices décrites à ce jour ne permettent de reconnaître que les purines, et le  
problème reste quasiment entier quant au développement de motifs structuraux  
reconnaissant les pyrimidines. (Griffin, L.C. ; Kiessling, L.L. ; Beal, P.A. ;  
Gillespie, P. ; Dervan, P.B., *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 7976-7982 ; Huang,  
C.Y. ; Miller, P.S., *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 10456-10457). En outre, ce  
20 mode de ciblage de séquence requiert un changement conformationnel préalable  
de la séquence-cible, l'ADN passant de la conformation naturelle B à une  
conformation A possédant un grand sillon plus profond. Ce processus est très lent  
(Maher III, L.J. ; Dervan, P.B. ; Wold, B.J., *Biochem.* 1990, 29, 8820-8826 ;  
Rougée, M. ; Faucon, B. ; Mergny, J.L. ; Barcelo, F. ; Giovannangeli, C. ;  
25 Garestier, T. ; Helene, C., *Biochem.* 1992, 31, 9269-9278), et de ce fait  
l'application de cette technique dans un contexte biologique où l'oligonucléotide  
doit chercher sa cible dans des milliers de mégabases d'ADN semble difficilement  
envisageable à l'avenir.

- Il a également été proposé de synthétiser des acides nucléiques  
30 peptidiques où le squelette naturel ribose-phosphate est remplacé par un  
polyamide non chargé (Nielsen, P.E. ; Egholm, M. ; Berg, R.H. ; Buchardt, O.,  
*Science* 1991, 254, 1497-1500). Ces composés forment également des hélices  
triples et sont capables, dans certaines conditions, de remplacer un des brins de  
l'ADN par hybridation avec le brin complémentaire. Contrairement aux hélices  
35 triples, ce dernier mode de ciblage est basé sur les sites de liaisons hydrogène  
Crick et Watson et s'applique donc à toutes les séquences. Par contre, ce mode de  
ciblage est lent et nécessite l'ouverture préalable du duplex-cible (Egholm, M. ;

- 4 -

Buchardt, O. ; Christensen, L. ; Behrens, C. ; Freier, S.M. ; Driver, D.A. ; Berg, R.H. ; Kim, S.K. ; Norden, B. ; Nielsen, P.E., *Nature* 1993, 365, 566-568).

On connaît également, des techniques plus anciennes de remplacement de brin, qui requièrent aussi la dénaturation préalable de l'ADN.

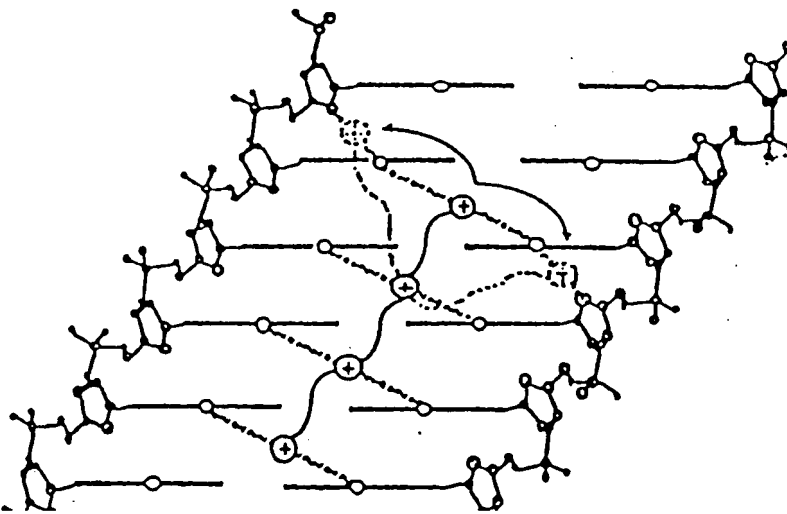
- 5 Ces techniques mettent en oeuvre, en dehors du traitement thermique par chauffage, la dénaturation alcaline (Corey, D.R. ; Pei, D. ; Schultz, P.G., *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 8523-8525) ou chaotrope (Chen, C.B. ; Gorin, M.B. ; Sigman, D.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 4206-4210), ou encore la formation de brins triples à l'aide de la protéine RecA (Ferrin, L. ; Camerini-Otero, R. *Science* 1991, 254, 1494-1497) ont été décrits.

La présente invention propose une nouvelle approche de la reconnaissance d'une séquence cible d'ADN qui ne présente pas les inconvénients mentionnés ci-dessus. Cette invention repose sur la structure des complexes formés par les polyamines linéaires avec les acides nucléiques (Garcia, A ; Giege, R. ; Behr, J.P., *Nucleic Acids Res.* 1990, 18, 89-95 ; Schmid, N. ; Behr, J.P., *Biochem.* 1991, 30, 4357-4361). Les polyamines naturelles comme la spermine et la spermidine se lient fortement à l'ADN ( $10^4$  -  $10^8$  M<sup>-1</sup> selon le milieu, Braunlin, W.H. ; Strick, T.J. ; Record, M.T.Jr., *Biopolymers* 1982, 21, 1301-1314). Il a été démontré que la spermine se fixait au fond du petit sillon par formation de multiples liaisons hydrogène entre ses groupements ammonium NH<sub>2</sub><sup>+</sup> et les atomes O<sub>2</sub> et N<sub>3</sub> des pyrimidines et des purines. Ces liaisons intermoléculaires pontent les deux brins de l'ADN, selon la représentation schématique ci-après, dans laquelle la vue est dans le plan des bases nucléiques pointant leurs atomes O<sub>2</sub> et N<sub>3</sub> (-O-) en direction des groupements NH<sub>2</sub><sup>+</sup> (⊕) de la polyamine.

25

30

35



- 4 -

Buchardt, O. ; Christensen, L. ; Behrens, C. ; Freier, S.M. ; Driver, D.A. ; Berg, R.H. ; Kim, S.K. ; Norden, B. ; Nielsen, P.E., *Nature* 1993, 365, 566-568).

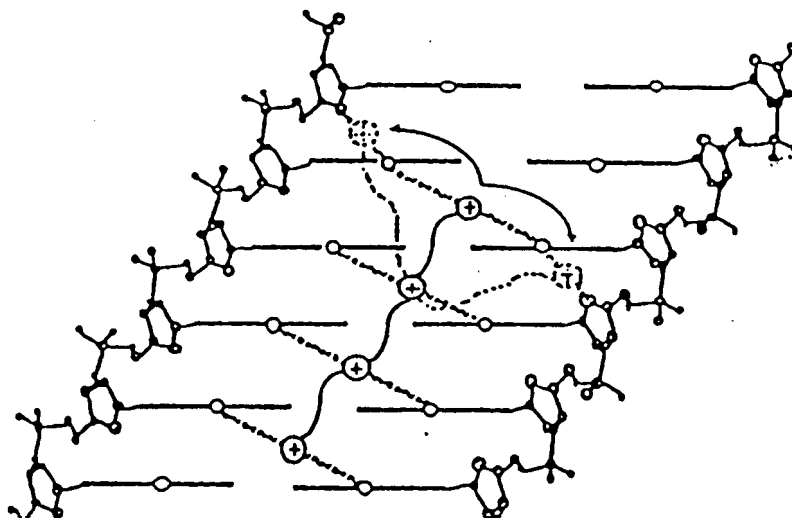
On connaît également, des techniques plus anciennes de remplacement de brin, qui requièrent aussi la dénaturation préalable de l'ADN. Ces techniques mettent en oeuvre, en dehors du traitement thermique par chauffage, la dénaturation alcaline (Corey, D.R. ; Pei, D. ; Schultz, P.G., *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 8523-8525) ou chaotrope (Chen, C.B. ; Gorin, M.B. ; Sigman, D.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 4206-4210), ou encore la formation de brins triples à l'aide de la protéine RecA (Ferrin, L. ; Camerini-Otero, R. *Science* 1991, 254, 1494-1497) ont été décrits.

La présente invention propose une nouvelle approche de la reconnaissance d'une séquence cible d'ADN qui ne présente pas les inconvénients mentionnés ci-dessus. Cette invention repose sur la structure des complexes formés par les polyamines linéaires avec les acides nucléiques (Garcia, A ; Giege, R. ; Behr, J.P., *Nucleic Acids Res.* 1990, 18, 89-95 ; Schmid, N. ; Behr, J.P., *Biochem.* 1991, 30, 4357-4361). Les polyamines naturelles comme la spermine et la spermidine se lient fortement à l'ADN ( $10^4$  -  $10^8$  M<sup>-1</sup> selon le milieu, Braunlin, W.H. ; Strick, T.J. ; Record, M.T.Jr., *Biopolymers* 1982, 21, 1301-1314). Il a été démontré que la spermine se fixait au fond du petit sillon par formation de multiples liaisons hydrogène entre ses groupements ammonium  $\text{NH}_2^+$  et les atomes O2 et N3 des pyrimidines et des purines. Ces liaisons intermoléculaires pontent les deux brins de l'ADN, selon la représentation schématique ci-après, dans laquelle la vue est dans le plan des bases nucléiques pointant leurs atomes O2 et N3 (-O-) en direction des groupements  $\text{NH}_2^+$  ( $\oplus$ ) de la polyamine.

25

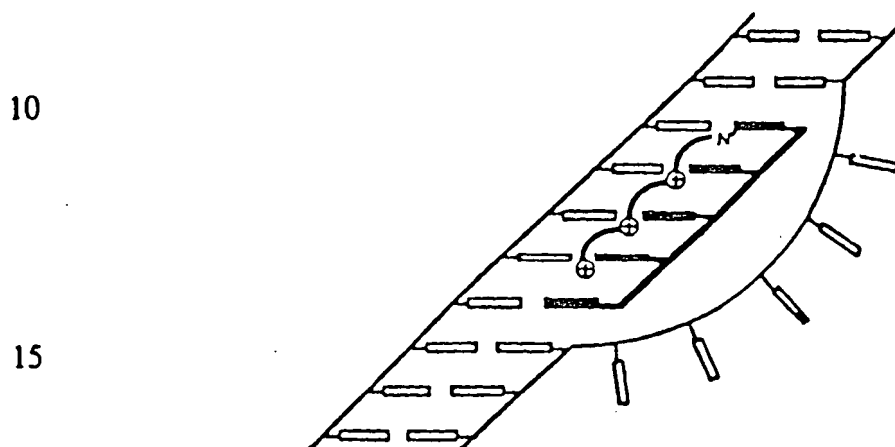
30

35



- 5 -

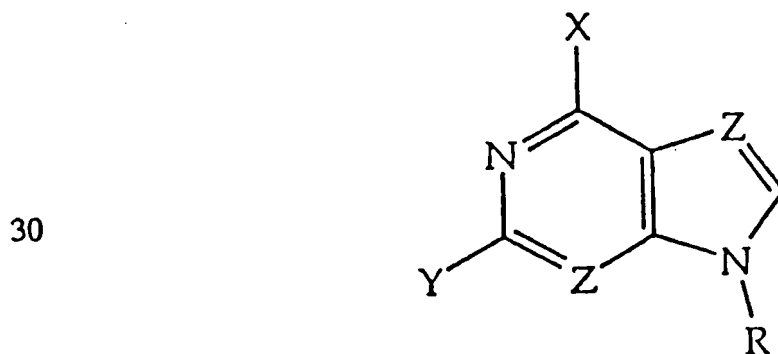
Par conséquent, une synthèse d'un oligonucléotide complémentaire d'une séquence-cible, sur lequel sont greffés des polyamines en due place, c'est-à-dire permettant l'établissement de ce faisceau de liaisons non covalentes, entraîne que l'appariement de cette molécule devra être bien plus fort que celui du duplex naturel. Il s'ensuit, comme il ressort de la représentation schématique ci-après, que la molécule de synthèse -en noir- va donc envahir la double hélice au niveau de sa cible et former une hernie à cet endroit :



La liaison covalente de la polyamine à la base nucléique de l'oligonucléotide doit conduire à son placement dans le petit sillon du duplex. L'examen précis de telles structures montre, par exemple, que la position du carbone C2 des purines est idéal pour greffer la polyamine.

La présente invention a pour objet des bases nucléiques polycationiques et les oligonucléotides les contenant, en particulier les purines substituées en C2, caractérisées en ce qu'elles présentent la structure suivante :

25



30

35

où X = OH ou NH<sub>2</sub> (séries de la guanine ou de la diaminopurine)  
où Z = N ou CH (purines ou déazapurines)

- 6 -

où Y est un groupement moléculaire ayant une affinité pour le petit sillon de l'ADN, par exemple les dérivés de la distamycine ou de la nétropsine, le bérénil, le colorant Hoechst 33258, ou un polypeptide cationique comme la polylysine, la polyarginine, la polyornithine, ou encore un polymère comme le polyéthylène ou le polypropylène imine.

Avantageusement, Y peut être une polyamine de formule générale  $-NH-((CH_2)_n-NH)_m-H$  où n est compris entre 2 et 6 inclusivement, m est compris entre 1 et 10 inclusivement et n peut varier entre les différents groupes compris entre deux atomes d'azote. La polyamine est, de préférence, la spermine ou la spermidine ou leurs dérivés capables de se lier à l'ADN.

R est un résidu bifonctionnel sur la base duquel peuvent être construits des oligomères capables de se lier à l'ADN ou à l'ARN. Ce résidu bifonctionnel peut avantageusement être le ribose, le 2'-désoxyribose et leurs dérivés, par exemple carbocycliques, halogénés, aminés ou azidés, l'oligomérisation étant obtenue par l'intermédiaire d'un groupement acide phosphorique naturel ou à l'aide de groupements favorisant la pénétration intracellulaire ou protégeant la molécule contre les nucléases, tels que les alkylphosphates, les phosphonates, les phosphorothioates, les méthylphosphonates, les carbonates et les carbamates.

R peut également être un aminoacide tel que ceux décrits par Nielsen et al. (Nielsen, P.E. ; Egholm, M. ; Berg, R.H. ; Buchardt, O., *Science* 1991, 254, 1497-1500).

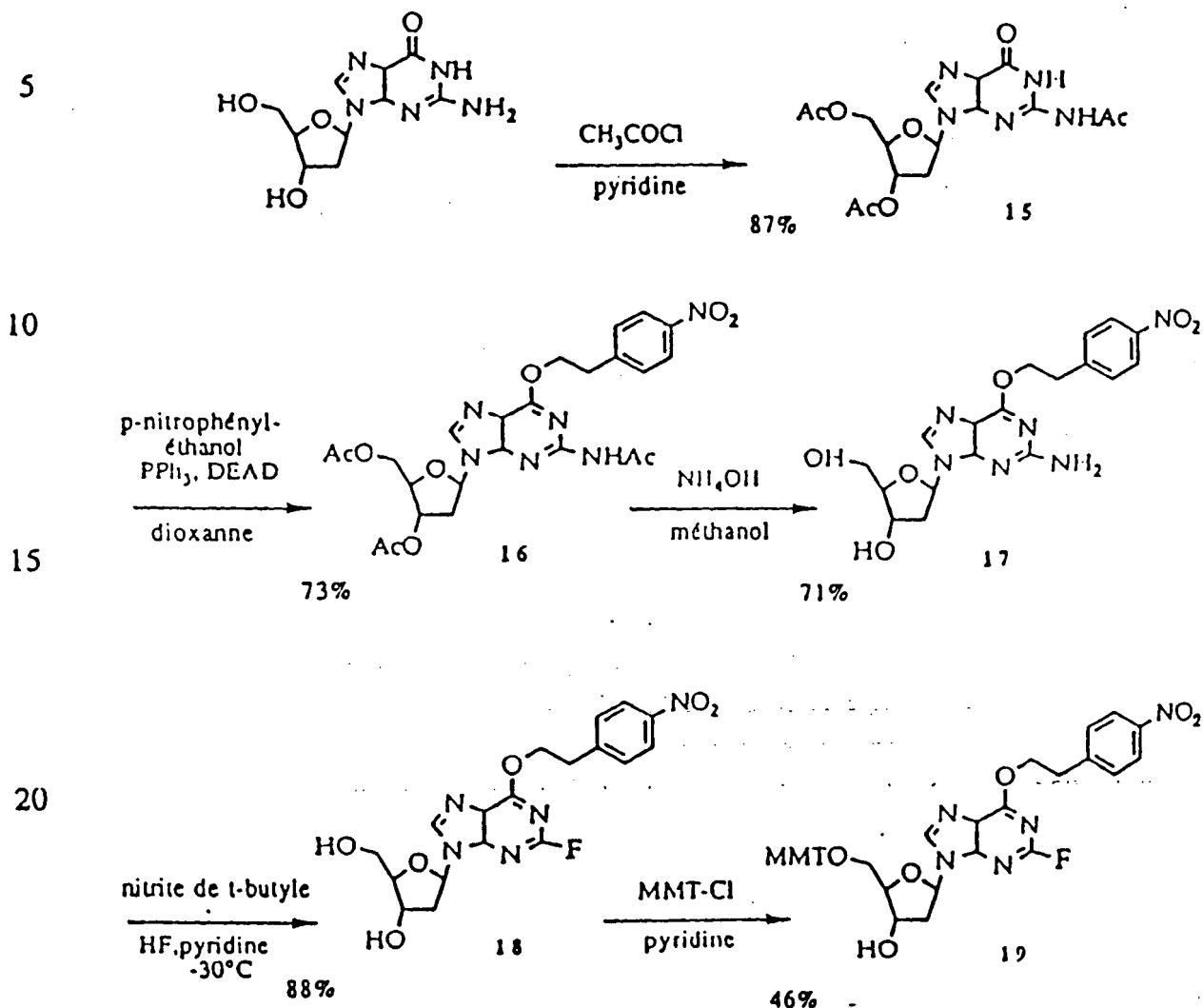
L'invention a également pour objet un procédé de préparation des bases telles que définies par la formule générale ci-dessus, caractérisé en ce que, pour la synthèse du précurseur de la C<sub>2</sub>-spermine-guanosine, il présente la succession des étapes suivantes :

30

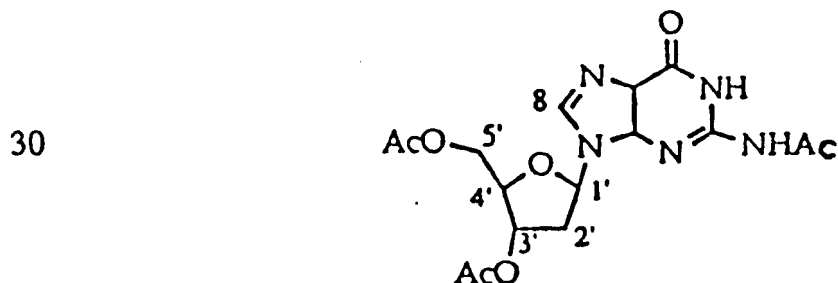
35



- 7 -

EXEMPLE 1Synthèse du précurseur de la C2-spermine-guanosine

Etape 15, obtention de : (2-N,3'-O,5'-O-triacétyl)-2'-désoxyguanosine



35 1 g de monohydrate de désoxyguanosine (3,5 mmol) est mis en suspension dans 100 ml de pyridine anhydre. Le chlorure d'acétyl (1,5 ml, 21 mmol) est rajouté goutte à goutte à une température de 0°C. La solution devenue limpide au bout d'une heure est laissée à température ambiante pendant 3

- 8 -

heures. Ensuite, de l'eau (0,5 ml) est rajoutée afin de stopper la réaction et la solution est mise à évaporer. Le dérivé triacétylé est alors purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH 5 % à 10 %), (1,21 g, R = 87 %)

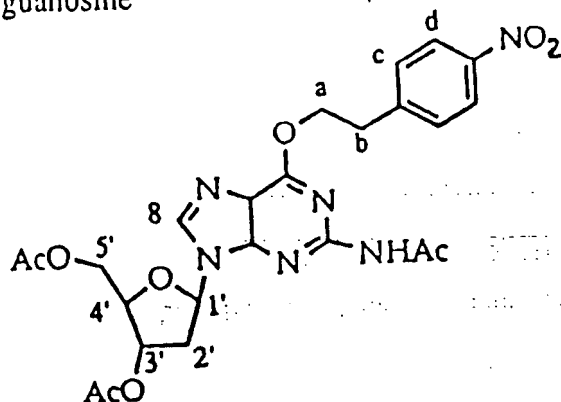
5 CCM ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH 5 %)  $R_f = 0,23$

La structure du produit obtenu est confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire  $\text{RMN}^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) et les déplacements chimiques  $\delta$ (ppm) s'établissent à : 2,04 (s, 3H, O-Ac) ; 2,11 (s, 3H, O-Ac) ; 2,23 (s, 3H, N-Ac) ; 2,53-2,67 (m, 1H,  $\text{H}_2'$ ) ; 2,92-3,03 (m, 1H,  $\text{H}_2''$ ) ; 4,25-4,38 (m, 3H,  $\text{H}_4'$  et  $\text{H}_5'$ ) ;  
 10 5,39-5,48 (m, 1H,  $\text{H}_3'$ ) ; 6,33 (t,  $J = 6,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_1'$ ) ; 8,09 (s, 1H, Hg).

Etape 16, obtention de : 2-N,3'-O,5'-O-triacétyl-6-O-p-nitrophényléthyl-2'-désoxyguanosine

15

20



La désoxyguanosine triacétylée (0,7 g, 1,78 mmol) est mise en solution dans 40 ml de dioxanne anhydre. Ensuite sont rajoutés successivement : 0,7 g de triphénylphosphine (2,67 mmol), 0,41 ml de diéthylazodicarboxylate (2,67 mmol) et 0,44 mg de p-nitrophényléthanol (2,67 mmol). Le mélange est  
 25 laissé à température ambiante sous agitation pendant 24 h, puis le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans 50 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et la phase organique est lavée à l'eau (2 x 30 ml) puis séchée sur du sulfate de magnésium. Le composé selon l'étape 16 est purifié par chromatographie sur plaque de silice 4 mm au  
 30 chromatotron (éluant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH 0 à 2 %) (0,71 g, R = 73 %).  
 CCM ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH 5 %)  $R_f = 0,44$

La structure du produit obtenu est confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire  $\text{RMN}^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) et les déplacements chimiques  $\delta$ (ppm) s'établissent à : 2,09 (s, 3H, O-Ac) ; 2,15 (s, 3H, O-Ac) ; 2,5 (s, 3H, N-Ac) ; 2,53-2,66 (m, 1H,  $\text{H}_2'$ ) ; 2,93-3,05 (m, 1H,  $\text{H}_2''$ ) ; 3,32 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ) ; 4,33-4,52 (m, 3H,  $\text{H}_4'$  et  $\text{H}_5'$ ) ; 4,79 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $\text{H}_a$ ) ; 5,41-5,46 (m,  
 35

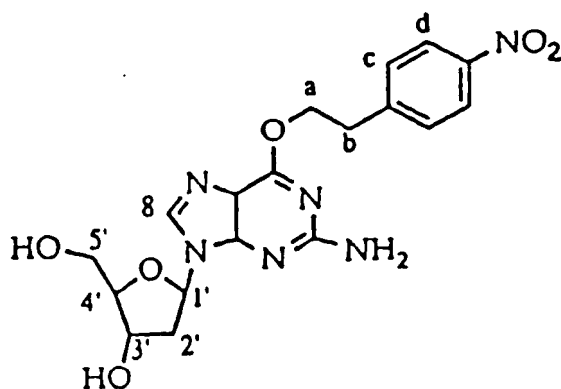
- 9 -

1H, H<sub>3'</sub>) ; 6,35 (t, J = 6,3 Hz, 1H, H<sub>1'</sub>) ; 7,51 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H<sub>C</sub>) ; 7,97 (s, 1H, H<sub>8</sub>) ; 7,99 (s, 1H, H<sub>NH</sub>) ; 8,18 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H<sub>D</sub>).

Etape 17, obtention de : 6-O-p-nitrophényléthyl-2'-désoxyguanosine

5

10



Le composé obtenu suivant l'étape 16 (1,2 g, 2,21 mmol) est mis en solution dans un mélange de 25 ml de méthanol et de 20 ml d'ammoniaque en solution à 32 %. La déprotection est suivie par CCM. La déprotection des groupements O-acétyl est très rapide, à savoir inférieure à 2 heures, tandis que celle du N-acétyl s'effectue en plusieurs jours. La solution est ensuite soumise à évaporation sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris dans 100 ml d'acétate d'éthyle et la phase organique est lavée avec 150 ml d'eau puis séchée sur du sulfate de magnésium.

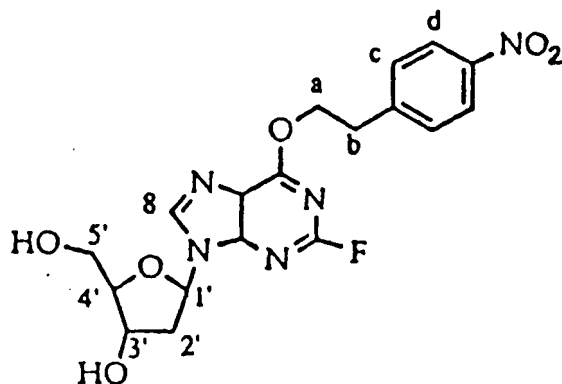
Le composé obtenu suivant l'étape 17 est purifié par chromatographie sur plaque de silice 4 mm au chromatotron (éluant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH 1 à 5 %), le brut de la réaction étant déposé sur la plaque dans le méthanol pur (0,65 g, R = 71 %).

CCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH 10 %) R<sub>f</sub> = 0,43

La structure du produit obtenu est confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire RMN<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) et les déplacements chimiques δ(ppm) s'établissent à : 2,52-2,42 (m, 1H, H<sub>2'</sub>) ; 2,67-2,83 (m, 1H, H<sub>2''</sub>) ; 3,26 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H<sub>b</sub>) ; 3,66-3,88 (m, 2H, H<sub>5'</sub>) ; 4-4,06 (m, 1H, H<sub>4'</sub>) ; 4,51-4,56 (m, 1H, H<sub>3'</sub>) ; 4,74 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H<sub>d</sub>) ; 6,32 (t, J = 6,5 Hz, 1H, H<sub>1'</sub>) ; 7,57 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H<sub>C</sub>) ; 8,03(s, 1H, H<sub>8</sub>) ; 8,14 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H<sub>D</sub>).

- 10 -

Etape 18, obtention de : 6-O-p-nitrophényléthyl-2-fluoro-2'-désoxyinosine



10

Tous les réactifs sont portés à  $-78^{\circ}\text{C}$  avant d'effectuer leur mélange à cette même température. 240 mg de composé obtenu suivant l'étape 17 (0,57 mmol) sont dissous, dans un tube en téflon, dans 2,5 ml d'une solution à 65 % d'acide fluorhydrique dans la pyridine, 97 ml (0,8 mmol) de nitrite de t-butyle étant alors rajoutés sous agitation. La température de la solution est ensuite augmentée à  $-30^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes, pour être ramenée à  $-78^{\circ}\text{C}$ . La solution obtenue est alors neutralisée avec de l'ammoniaque. La température de cette solution ne doit pas dépasser  $-15^{\circ}\text{C}$  tant que tout l'acide fluorhydrique n'a pas été neutralisé. Le composé fluoré est isolé par précipitation dans l'eau (15 ml) avec un rendement de 88 % (214 mg).

20

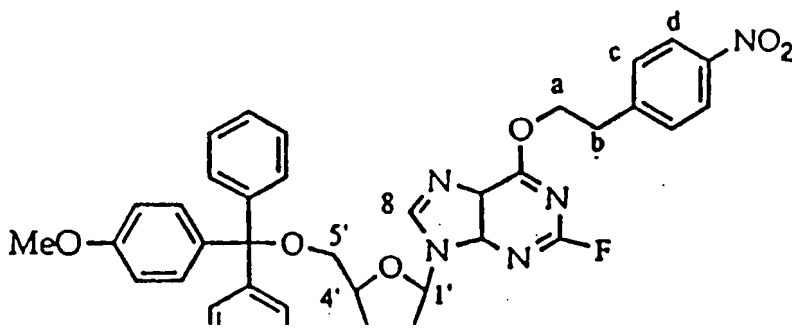
CCM ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH 5 %)  $R_f = 0,3$

La structure du produit obtenu est confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire  $\text{RMN}^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) et les déplacements chimiques  $\delta(\text{ppm})$  s'établissent à : 2,4-2,51 (m, 1H,  $\text{H}_2'$ ) ; 2,67-2,84 (m, 1H,  $\text{H}_2''$ ) ; 3,29 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ) ; 3,62-3,88 (m, 2H,  $\text{H}_5'$ ) ; 3,97-4,03 (m, 1H,  $\text{H}_4'$ ) ; 4,5-4,57 (m, 1H,  $\text{H}_3'$ ) ; 4,83 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $\text{H}_d$ ) ; 6,38 (t,  $J = 6,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_1'$ ) ; 7,57 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H,  $\text{H}_c$ ) ; 8,14 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H,  $\text{H}_d$ ) ; 8,47 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ).

25

Etape 19, obtention de : 6-O-p-nitrophényléthyl-2-fluoro-5'-monométhoxytrityl-2'-désoxyinosine

30



35

- 11 -

214 mg (0,51 mmol) de composé suivant l'étape 18 sont mis en solution dans 5 ml de pyridine anhydre. Après l'addition de 314 mg de chlorure de monométhoxytrityle (MMT-Cl) (1mmol), la solution est laissée à température ambiante, sous agitation, pendant 16 heures. La pyridine est évaporée et le résidu sec est repris dans 20 ml de chlorure de méthylène. La phase organique est alors lavée avec 20 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 1 %. Ensuite, le composé obtenu dans cette étape 19 est purifié par chromatographie sur plaque de silice 2 mm au chromatotron (éluant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH 2 %) (171 mg, R = 46 %) CCM ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH 10 %)  $R_f = 0,66$

La structure du produit obtenu est confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire  $\text{RMN}^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) et les déplacements chimiques  $\delta(\text{ppm})$  s'établissent à : 2,5-2,59 (m, 1H,  $\text{H}_2'$ ) ; 2,75-2,86 (m, 1H,  $\text{H}_2''$ ) ; 3,32 (t, J = 6,7 Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ) ; 3,36-3,5 (m, 2H,  $\text{H}_5'$ ) ; 3,79 (s, 3H, O-Me) ; 4,08-4,15 (m, 1H,  $\text{H}_4'$ ) ; 4,62-4,72 (m, 1H,  $\text{H}_3'$ ) ; 4,83 (t, J = 6,7 Hz, 2H,  $\text{H}_a$ ) ; 6,37 (t, J = 6,5 Hz, 1H,  $\text{H}_1'$ ) ; 6,81 (d, 2H, J = 8,8 Hz, Htrityl en a OMe) ; 7,21-7,42 (m, 12H, Htrityl) ; 7,49 (d, J = 8,7 Hz, 2H,  $\text{H}_c$ ) ; 8,03 (s, 1H,  $\text{H}_g$ ) ; 8,17 (d, J = 8,7 Hz, 2H,  $\text{H}_d$ ).

Spectre de masse (FAB) : 692 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) (pic majoritaire à 273 de MMT+).

Pour la synthèse d'un oligonucléotide contenant deux  $\text{C}_2$ -spermine-guanosines le procédé présente la succession des étapes suivantes :

25

30

35

- 13 -

Etape 20, phosphorylation du nucléoside :

Le nucléoside (61 mg, 85  $\mu$ mol) est d'abord lyophilisé dans du benzène pour éliminer toute trace d'eau, puis repris, sous argon, dans 4 ml de chlorure de méthylène anhydre. Ensuite deux équivalents de phosphorodiamidite (53 mg) et 0,6 équivalent de tétrazole (135  $\mu$ l d'une solution commerciale à 0,4 M) sont rajoutés. La solution est laissée sous argon pendant 12 heures, le composé ainsi obtenu étant purifié par chromatographie sur plaque de silice 2 mm au chromatotron (éluant :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). (34 mg, R = 43 %).

CCM ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH 5 %)  $R_f = 0,77$

10 La structure du produit obtenu est confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire RMN 31p ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ), pic caractéristique à 149 ppm du phosphoramidite.

Etape 21, synthèse de l'oligonucléotide ATTG\*AATG\*TTT :

15 La synthèse de l'oligonucléotide, contenant deux C2-spermine guanosines, a été faite sur un synthétiseur automatique Biosearch 8600. Le programme de couplage standard pour une synthèse de 1  $\mu$  mol a été utilisé (avec un excès de 20 équivalents du phosphoroamidite de la base modifiée). Seul le sous-programme pour la déprotection du groupement trityl a été modifié : le temps de réaction a été augmenté de 8 à 20 s et un cycle supplémentaire a été rajouté. Le dernier groupement trityl a été conservé pour faciliter la purification de l'oligonucléotide par HPLC sur une colonne de silice C18 inverse.

25 Etape 22, incorporation de la spermine, déprotection et purification de l'oligonucléotide :

La résine (15 mg) contenant l'oligonucléotide est mise dans 300  $\mu$ l d'une solution de spermine (1 M) dans le méthanol pendant 3 jours à 55°C. L'oligonucléotide est ensuite purifié par HPLC sur une colonne Millipore Nova Pak avec un gradient croissant en acétonitrile (de 5 % à 40 % en 40 minutes) dans du tampon acétate de triéthylammonium 100 mM pH 6,5. Le temps de rétention est de 27 minutes. Ensuite, pour déprotéger le groupement p nitrophényléthyl, l'oligonucléotide purifié est mis dans 500  $\mu$ l de DBU 0,5 M dans la pyridine pendant 24 heures à 55°C. Une extraction chloroforme/eau permet de récupérer l'oligonucléotide dans la phase aqueuse qui est évaporée puis reprise dans l'acide acétique à 80 % pour déprotéger le groupement 5'-trityl. L'oligonucléotide modifié complètement déprotégé est de nouveau purifié par HPLC (même colonne et gradient que précédemment, temps de rétention de 13 minutes).

- 14 -

La structure de l'oligonucléotide est confirmée par la spectroscopie de masse en électro spray négatif qui donne une masse de  $3727 \pm 3$ .

Par mesure des températures de fusion des duplex, il a été vérifié que l'oligonucléotide contenant deux spermines forme un duplex plus stable avec sa  
 5 séquence complémentaire que ne le fait l'oligonucléotide naturel. Les mesures ont été faites dans un tampon MES 10 mM à différentes concentrations salines, comme il ressort du tableau 1 ci-dessous. Les écarts de stabilité sont plus importants à faible concentration saline et se réduisent au fur et à mesure que l'on  
 10 augmente la concentration en sel. Dans des conditions de force ionique correspondant à un milieu physiologique, la différence entre les températures de fusion est encore de  $15^{\circ}\text{C}$  en faveur du duplex modifié. Une variation du pH de 6 à 7 n'a entraîné aucune différence. Par un rajout de la spermine exogène (cf. tableau 2 ci-dessous), le duplex non modifié est stabilisé progressivement, mais il  
 15 reste nettement moins stable que le duplex modifié possédant deux spermines liées de manière covalente. De plus, pour l'obtention d'un effet de stabilisation, il est nécessaire de rajouter plus de deux équivalents de spermine. Comme prévu, pour le duplex avec l'oligonucléotide modifié aucune stabilisation n'est observée en rajoutant de la spermine.

20 Tableau 1 : Température de fusion (en  $^{\circ}\text{C}$ ) des duplex ( $2\mu\text{M}$ ) dans un tampon MES 10 mM, pH6

NaCl	20mM	50mM	100mM	150mM
duplex normal ATTGAATGTTT TAACTTACAAA	17,5	24,3	29,5	32,4
duplex avec oligonucléotide modifié ATTG*AATG*TTT TAAC TTACAAA	41,7	45	47	47,2

25 Tableau 2 : Températures de fusion (en  $^{\circ}\text{C}$ ) des duplex ( $2\mu\text{M}$ ) dans un tampon MES 10 mM, pH6,8

- 15 -

Spermine	4 $\mu$ M (2 $\epsilon$ q)	20 $\mu$ M (10 $\epsilon$ q)	0,2 mM (100 $\epsilon$ q)	1mM (500 $\epsilon$ q)
duplex normal ATTGAATGTTT TAACTTACAAA	32,5	33	35,2	36,6
duplex avec oligo- nucléotide modifié ATTG*AATG*TTT TAAC TTACAAA	47,3	47,2	47,4	47,5

Des expériences d'électrophorèse sur gels d'acrylamide 20 % ont permis de montrer que si l'oligonucléotide modifié est rajouté dans une solution contenant le duplex normal, on forme le duplex avec l'oligonucléotide modifié, ce dernier déplaçant le brin déjà apparié pour former un duplex plus stable. En effet, le duplex naturel, le duplex modifié et les oligonucléotides simple brin originels présentent des distances de migration caractéristiques : duplex normal (51 mm), duplex modifié (45 mm), oligonucléotide non modifié (62 mm), oligonucléotide modifié (37 mm). Ces expériences ont été réalisées dans un tampon MES 10 mM, pH6, NaCl 150 mM, spermine 1 mM, avec une concentration en duplex et en oligonucléotide de 2  $\mu$ M. Les mélanges ont été faits à 0°C ou à température ambiante et le résultat a été identique. Le remplacement du brin déjà apparié est très rapide, le temps de réaliser le mélange et de le déposer sur le gel étant suffisant. L'électrophorèse est réalisée à 4°C sous une tension de 80V pendant 12 heures pour l'obtention d'un gel de 15 cm de long et de 0,1 cm d'épaisseur.

Selon une caractéristique de l'invention, les nouvelles bases nucléiques sont utilisées pour la reconnaissance d'une séquence-cible d'ADN par synthèse d'un oligomère de séquence complémentaire à celle de l'un des deux brins de la séquence concernée. A cet effet, l'oligomère comportera, en un ou plusieurs endroits de sa séquence, une base modifiée conformément à l'invention. Grâce à la présence de ces groupements présentant une forte affinité pour le petit sillon de l'ADN, l'oligomère va instantanément s'associer à l'ADN, de manière peu ou non sélective de séquence, et voyager le long de l'acide nucléique. Ce processus favorise la recherche de la cible et peut être avantageusement comparé aux techniques décrites dans l'art antérieur. Par conséquent, l'association est rapide et ne nécessite pas la dénaturation préalable du duplex ciblé. En outre, cette



- 16 -

technique est générale, car elle permet la reconnaissance des quatre bases nucléiques au sens de Crick et Watson. Enfin, l'art antérieur révèle que les polyamines favorisent grandement la pénétration de polynucléotides dans les cellules (Behr, J.P. ; Demeneux, B. ; Loeffler, J.P. ; Perez-Mutul, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 6982-6986 ; FR-A-2 645 866 ; FR-A-2 646 161 et EP-A-0 394 111, demande de brevet français n° 94 00159).

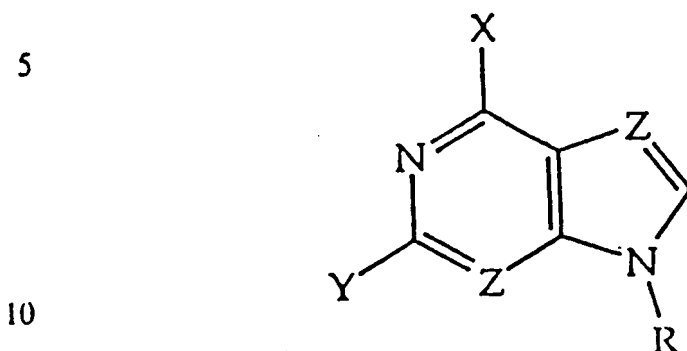
Selon une autre caractéristique de l'invention, les nouvelles bases nucléiques sont utilisées pour la reconnaissance de séquence par formation d'hélices triples selon la technique dite "antigène" (N.T. Thuong et C. Helene, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1993, 32, 666-690). A l'aide des oligomères conformes à l'invention, la présence notamment d'un groupement polycationique peut stabiliser fortement la liaison de ces molécules à l'ADN dans le grand sillon sous forme A (Garcia, A. ; Giege, R. ; Behr, J.P., *Nucleic Acids Res.* 1990, 18, 89-95 ; Schmid, N. ; Behr, J.P., *Biochem.* 1991, 30, 4357-4361).

Conformément à une autre caractéristique de l'invention, les nouvelles bases nucléiques peuvent également être utilisées pour la reconnaissance de séquences d'ARN messager par la technique dite "antisens". Cette technique est décrite par C. Helene et J.J. Toulmé, dans *Biochim. Biophys. Acta* 1990, 1049, 99-125.

Bien entendu, la présente invention ne se limite nullement aux indications et aux applications décrites. D'autres indications et applications sont possibles, ainsi que des modifications aux indications et aux applications décrites, sans sortir pour autant du domaine de protection de l'invention.

## REVENDICATIONS

1. Bases nucléiques polycationiques et oligonucléotides les contenant, en particulier purines substituées en C2, caractérisées en ce qu'elles présentent la structure suivante :



où X = OH ou NH<sub>2</sub> (séries de la guanine ou de la diaminopurine)

où Z = N ou CH (purines ou déazapurines)

où Y est un groupement moléculaire ayant une affinité pour le petit  
 15 sillon de l'ADN, par exemple les dérivés de la distamycine ou de la nétropsine, le bérénil, le colorant Hoechst 33258, ou un polypeptide cationique comme la polylysine, la polyarginine, la polyornithine, ou encore un polymère comme le polyéthylène ou le polypropylène imine.

2. Bases, suivant la revendication 1, caractérisées en ce que Y est  
 20 avantageusement une polyamine de formule générale -NH-((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH)<sub>m</sub>-H où n est compris entre 2 et 6 inclusivement, m est compris entre 1 et 10 inclusivement et n peut varier entre les différents groupes compris entre deux atomes d'azote.

3. Bases, suivant la revendication 2, caractérisées en ce que la  
 25 polyamine est, de préférence, la spermine ou la spermidine ou leurs dérivés capables de se lier à l'ADN.

4. Bases, suivant la revendication 1, caractérisées en ce que R est un résidu bifonctionnel sur la base duquel peuvent être construits des oligomères capables de se lier à l'ADN ou à l'ARN.

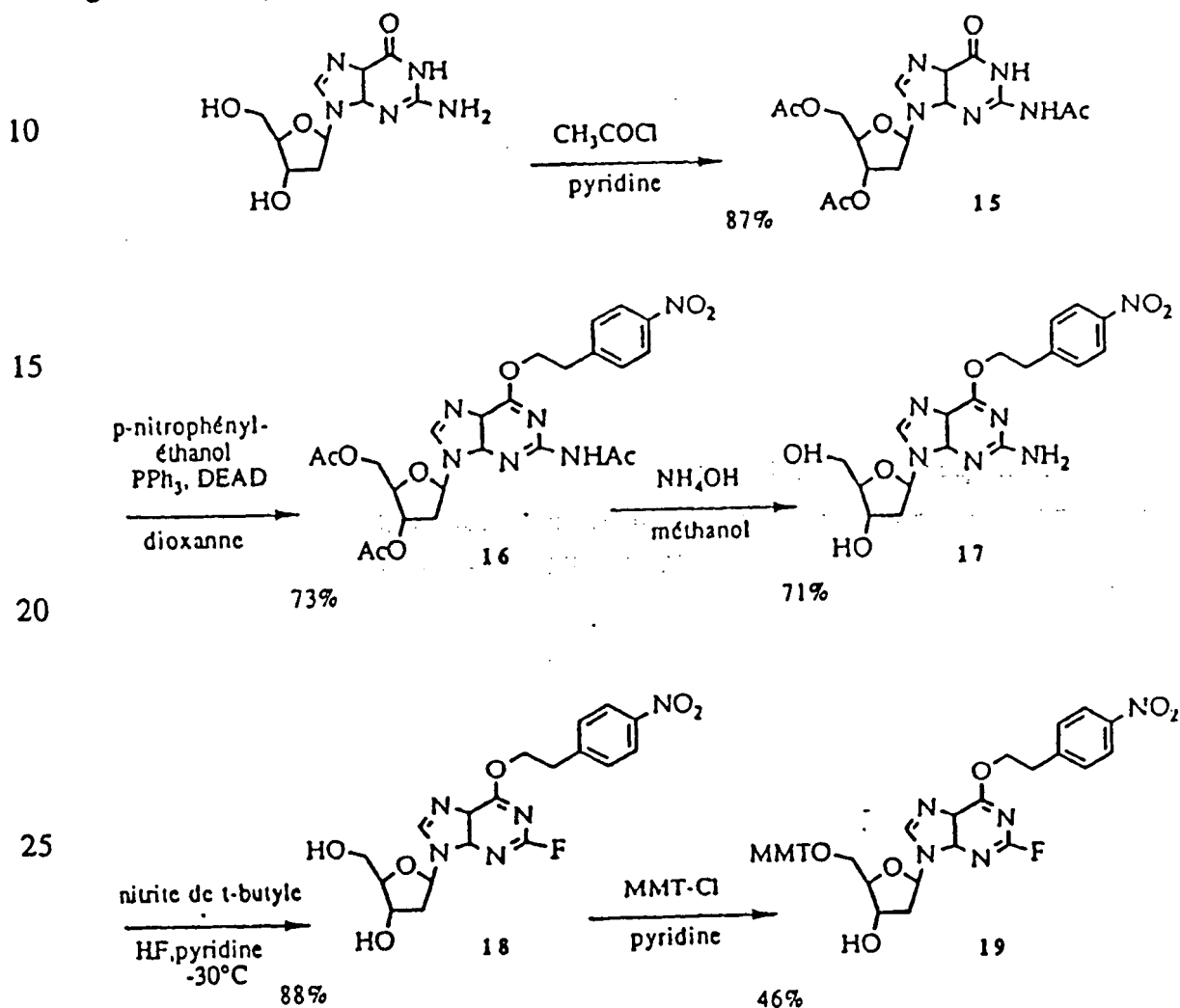
5. Bases, suivant la revendication 4, caractérisées en ce que le résidu  
 30 bifonctionnel est avantageusement le ribose, le 2'-désoxyribose et leurs dérivés, par exemple carbocycliques, halogénés, aminés ou azidés, l'oligomérisation étant obtenue par l'intermédiaire d'un groupement acide phosphorique naturel ou à l'aide de groupements favorisant la pénétration intracellulaire ou protégeant la molécule

- 18 -

contre les nucléases, tels que les alkylphosphates, les phosphonates, les phosphorothioates, les méthylphosphonates, les carbonates et les carbamates.

6. Bases, suivant la revendication 1, caractérisées en ce que R est un aminoacide.

7. Procédé de préparation de bases suivant la revendication 1, caractérisé en ce que, pour la synthèse du précurseur de la C<sub>2</sub>-spermine-guanosine, il présente la succession des étapes suivantes :



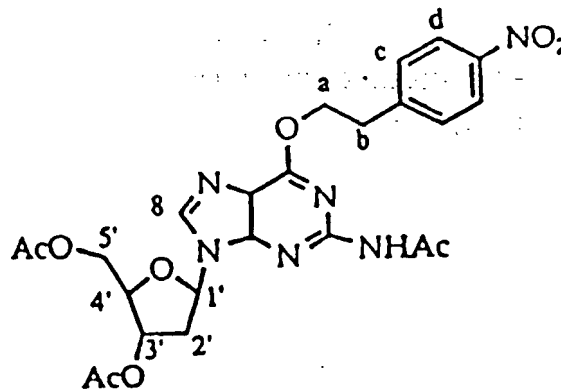
8. Procédé, suivant la revendication 7, caractérisé en ce que pour l'obtention de : (2-N,3'-O,5'-O-triacetyl)-2'-désoxyguanosine

- 19 -

1 g de monohydrate de désoxyguanosine (3,5 mmol) est mis en suspension dans 100 ml de pyridine anhydre, du chlorure d'acétyle (1,5 ml, 21 mmol) est rajouté goutte à goutte à une température de 0°C, la solution devenue limpide au bout d'une heure est laissée à température ambiante pendant 3 heures, ensuite, de l'eau (0,5 ml) est rajoutée afin de stopper la réaction et la solution est mise à évaporer, le dérivé triacétylé est alors purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH 5 % à 10 %), (1,21 g, R = 87 %) CCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH 5 %) R<sub>f</sub> = 0,23,

la structure du produit obtenu étant confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire RMN<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) et les déplacements chimiques δ(ppm) s'établissant à : 2,04 (s, 3H, O-Ac) ; 2,11 (s, 3H, O-Ac) ; 2,23 (s, 3H, N-Ac) ; 2,53-2,67 (m, 1H, H<sub>2'</sub>) ; 2,92-3,03 (m, 1H, H<sub>2''</sub>) ; 4,25-4,38 (m, 3H, H<sub>4'</sub> et H<sub>5'</sub>) ; 5,39-5,48 (m, 1H, H<sub>3'</sub>) ; 6,33 (t, J = 6,5 Hz, 1H, H<sub>1'</sub>) ; 8,09 (s, 1H, H<sub>8</sub>).

9. Procédé, suivant l'une quelconque des revendications 7 et 8, caractérisé en ce que pour l'obtention de : 2-N,3'-O,5'-O-triacétyl-6-O-p-nitrophényléthyl-2'-désoxyguanosine



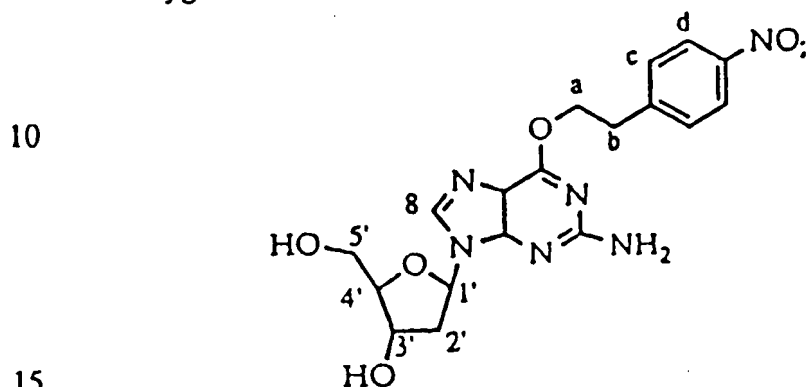
la désoxyguanosine triacétylée (0,7 g, 1,78 mmol) est mise en solution dans 40 ml de dioxanne anhydre, puis sont rajoutés successivement : 0,7 g de triphénylphosphine (2,67 mmol), 0,41 ml de diéthylazodicarboxylate (2,67 mmol) et 0,44 mg de p-nitrophényléthanol (2,67 mmol), ensuite le mélange est laissé à température ambiante sous agitation pendant 24 heures, puis le solvant est évaporé, le résidu est alors repris dans 50 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et la phase organique est lavée à l'eau (2 x 30 ml) puis séchée sur du sulfate de magnésium, le composé obtenu étant purifié par chromatographie sur plaque de silice 4 mm au chromatotron (éluant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH 0 à 2 %) (0,71 g, R = 73 %), CCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH 5 %) R<sub>f</sub> = 0,44,

la structure du produit obtenu étant confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) et les déplacements chimiques δ(ppm) s'établissant à : 2,09 (s, 3H, O-Ac) ; 2,15 (s, 3H, O-Ac) ; 2,5 (s, 3H, N-Ac) ; 2,53-

- 20 -

2,66 (m, 1H, H<sub>2'</sub>) ; 2,93-3,05 (m, 1H, H<sub>2''</sub>) ; 3,32 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H<sub>b</sub>) ; 4,33-4,52 (m, 3H, H<sub>4'</sub> et H<sub>5'</sub>) ; 4,79 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H<sub>a</sub>) ; 5,41-5,46 (m, 1H, H<sub>3'</sub>) ; 6,35 (t, J = 6,3 Hz, 1H, H<sub>1'</sub>) ; 7,51 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H<sub>c</sub>) ; 7,97 (s, 1H, H<sub>8</sub>) ; 7,99 (s, 1H, H<sub>NH</sub>) ; 8,18 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H<sub>d</sub>).

- 5 10. Procédé, suivant l'une quelconque des revendications 7 et 9, caractérisé en ce que pour l'obtention de : 6-O-p-nitrophényléthyl-2'-désoxyguanosine



- le composé 2-N,3'-O,5'-O-triacétyl-6-O-p-nitrophényléthyl-2'-désoxyguanosine (1,2 g, 2,21 mmol) est mis en solution dans un mélange de 25 ml de méthanol et de 20 ml d'ammoniaque en solution à 32 %, cette déprotection étant suivie par CCM et la déprotection des groupements O-acétyl étant très rapide, à savoir inférieure à 2 heures, tandis que celle du N-acétyl s'effectue en plusieurs jours, la solution est ensuite soumise à évaporation sous pression réduite et le résidu obtenu est repris dans 100 ml d'acétate d'éthyle et la phase organique est lavée avec 150 ml d'eau puis séchée sur du sulfate de magnésium, le composé ainsi obtenu est purifié par chromatographie sur plaque de silice 4 mm au chromatotron (éluant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH 1 à 5 %), le brut de la réaction étant déposé sur la plaque dans le méthanol pur (0,65 g, R = 71 %),

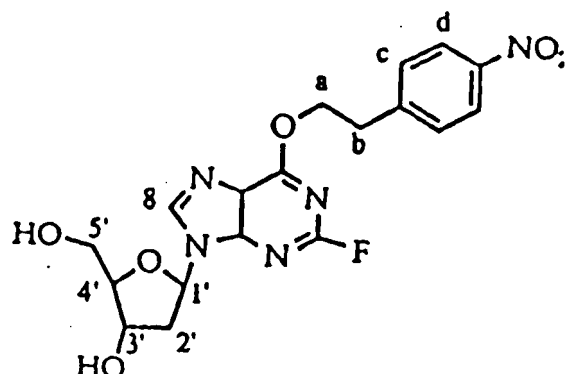
CCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH 10 %) R<sub>f</sub> = 0,43,

- la structure du produit obtenu étant confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire RMN<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) et les déplacements chimiques δ(ppm) s'établissant à : 2,52-2,42 (m, 1H, H<sub>2'</sub>) ; 2,67-2,83 (m, 1H, H<sub>2''</sub>) ; 3,26 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H<sub>b</sub>) ; 3,66-3,88 (m, 2H, H<sub>5'</sub>) ; 4-4,06 (m, 1H, H<sub>4'</sub>) ; 4,51-4,56 (m, 1H, H<sub>3'</sub>) ; 4,74 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H<sub>a</sub>) ; 6,32 (t, J = 6,5 Hz, 1H, H<sub>1'</sub>) ; 7,57 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H<sub>c</sub>) ; 8,03(s, 1H, H<sub>8</sub>) ; 8,14 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H<sub>d</sub>).

- 35 11. Procédé, suivant l'une quelconque des revendications 7 et 10, caractérisé en ce que pour l'obtention de : 6-O-p-nitrophényléthyl-2'-fluoro-2'-désoxyinosine

- 21 -

5



10 tous les réactifs sont portés à  $-78^{\circ}\text{C}$  avant d'effectuer leur mélange à cette même température, 240 mg de composé 6-O-p-nitrophényléthyl-2'-désoxyguanosine (0,57 mmol) sont dissous, dans un tube en téflon, dans 2,5 ml d'une solution à 65 % d'acide fluorhydrique dans la pyridine, 97 ml (0,8 mmol) de nitrite de t-butyle étant alors rajoutés sous agitation, la température de la solution est ensuite

15 augmentée à  $-30^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes, pour être ramenée à  $-78^{\circ}\text{C}$ , la solution obtenue est alors neutralisée avec de l'ammoniaque, la température de cette solution ne dépassant pas  $-15^{\circ}\text{C}$  tant que tout l'acide fluorhydrique n'a pas été neutralisé, le composé fluoré est isolé par précipitation dans l'eau (15 ml) avec un rendement de 88 % (214 mg),

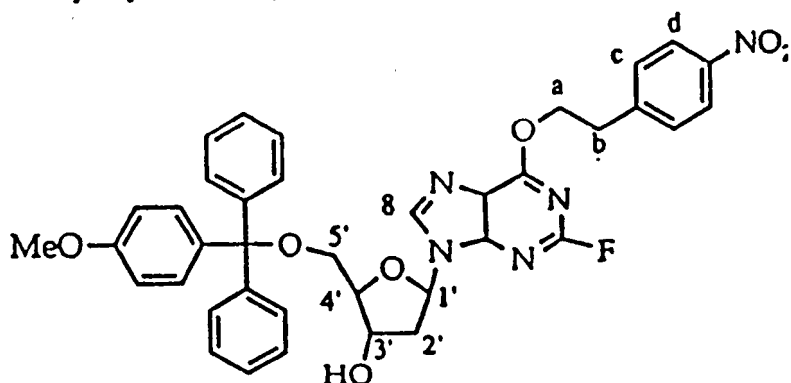
20 CCM ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH 5 %)  $R_f = 0,3$ ,

la structure du produit obtenu étant confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire  $\text{RMN}^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) et les déplacements chimiques  $\delta$ (ppm) s'établissant à : 2,4-2,51 (m, 1H,  $\text{H}_2'$ ) ; 2,67-2,84 (m, 1H,  $\text{H}_2''$ ) ; 3,29 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ) ; 3,62-3,88 (m, 2H,  $\text{H}_5'$ ) ; 3,97-4,03 (m, 1H,  $\text{H}_4'$ ) ; 4,5-4,57 (m, 1H,  $\text{H}_3'$ ) ;

25 4,83 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $\text{H}_a$ ) ; 6,38 (t,  $J = 6,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_1'$ ) ; 7,57 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H,  $\text{H}_c$ ) ; 8,14 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H,  $\text{H}_d$ ) ; 8,47 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ).

12. Procédé, suivant l'une quelconque des revendications 7 et 11, caractérisé en ce que pour l'obtention de : 6-O-p-nitrophényléthyl-2-fluoro-5'-monométhoxytrityl-2'-désoxyinosine

30



35

- 22 -

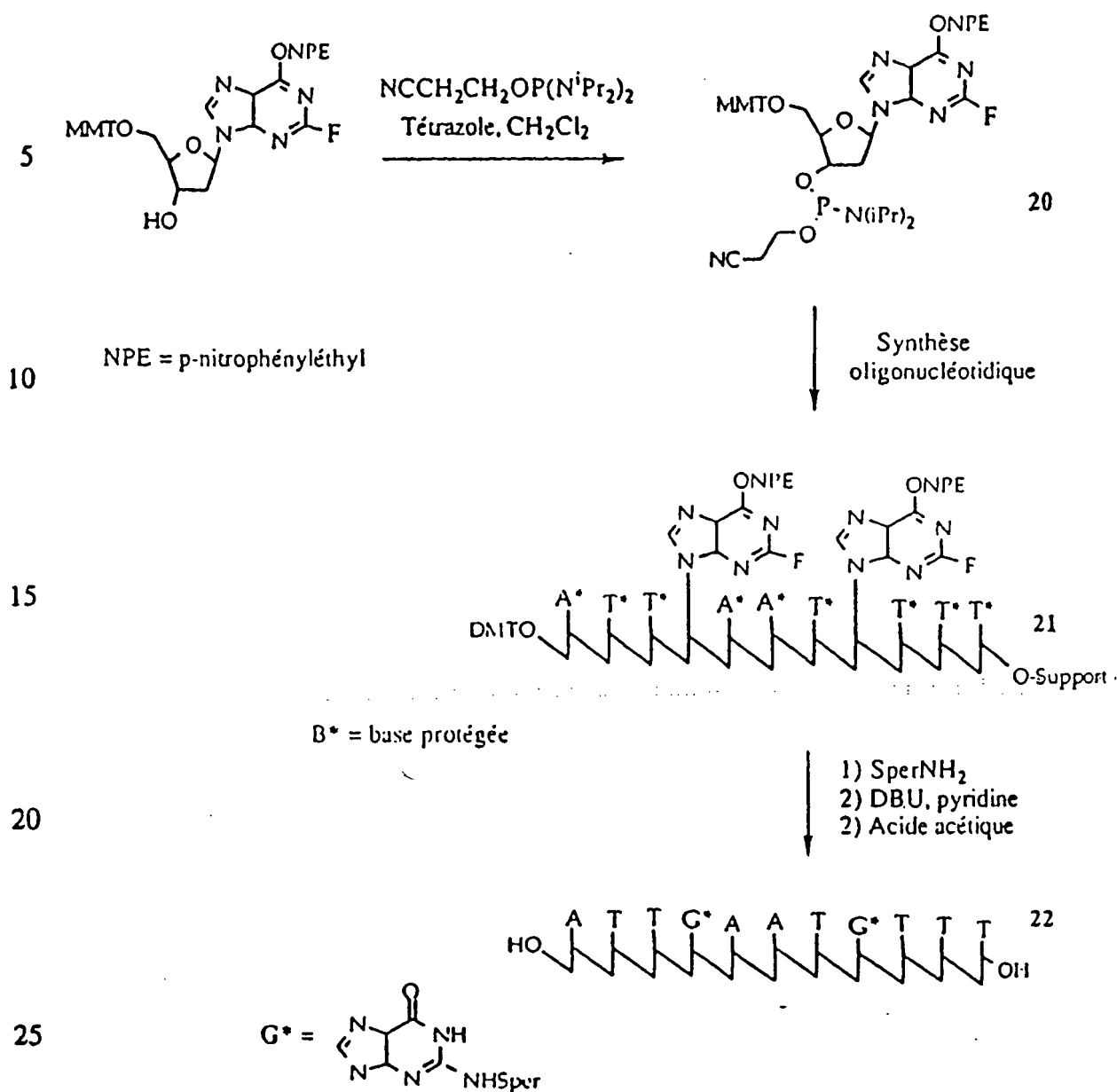
- 214 mg (0,51 mmol) de composé 6-O-p-nitrophényléthyl-2-fluoro-2'-désoxyinosine sont mis en solution dans 5 ml de pyridine anhydre, après l'addition de 314 mg de chlorure de monométhoxytrityle (MMT-Cl) (1mmol), la solution est laissée à température ambiante, sous agitation, pendant 16 heures, puis la pyridine
- 5 est évaporée et le résidu sec est repris dans 20 ml de chlorure de méthylène, la phase organique est alors lavée avec 20 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 1 %, ensuite, le composé ainsi obtenu est purifié par chromatographie sur plaque de silice 2 mm au chromatotron (éluant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH 2 %) (171 mg, R = 46 %)
- 10 CCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH 10 %) R<sub>f</sub> = 0,66,  
la structure du produit obtenu étant confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) et les déplacements chimiques  $\delta$ (ppm) s'établissant à : 2,5-2,59 (m, 1H, H<sub>2'</sub>) ; 2,75-2,86 (m, 1H, H<sub>2''</sub>) ; 3,32 (t, J = 6,7 Hz, 2H, H<sub>b</sub>) ; 3,36-3,5 (m, 2H, H<sub>5'</sub>) ; 3,79 (s, 3H, O-Me) ; 4,08-4,15 (m, 1H, H<sub>4'</sub>) ;
- 15 4,62-4,72 (m, 1H, H<sub>3'</sub>) ; 4,83 (t, J = 6,7 Hz, 2H, H<sub>a</sub>) ; 6,37 (t, J = 6,5 Hz, 1H, H<sub>1'</sub>) ; 6,81 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H<sub>trityl</sub> en a OMe) ; 7,21-7,42 (m, 12H, H<sub>trityl</sub>) ; 7,49 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H<sub>c</sub>) ; 8,03 (s, 1H, H<sub>8</sub>) ; 8,17 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H<sub>d</sub>),  
spectre de masse (FAB) : 692 (M+H<sup>+</sup>) (pic majoritaire à 273 de MMT<sup>+</sup>).
13. Procédé de préparation de bases suivant la revendication 1,
- 20 caractérisé en ce que, pour la synthèse d'un oligonucléotide contenant deux C<sub>2</sub>-spermine-guanosines le procédé présente la succession des étapes suivantes :

25

30

35

- 23 -



14. Procédé, suivant la revendication 13, caractérisé en ce que pour la phosphorylation du nucléoside, le nucléoside (61 mg, 85  $\mu$ mol) est d'abord lyophilisé dans du benzène pour éliminer toute trace d'eau, puis repris, sous argon, dans 4 ml de chlorure de méthylène anhydre, ensuite deux équivalents de phosphorodiamidite (53 mg) et 0,6 équivalent de tétrazole (135  $\mu$ l d'une solution commerciale à 0,4 M) sont rajoutés, la solution est laissée sous argon pendant 12 heures, le composé ainsi obtenu étant purifié par chromatographie sur plaque de silice 2 mm au chromatotron (éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). (34 mg, R = 43 %), CCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH 5 %) R<sub>f</sub> = 0,77,



- 24 -

la structure du produit obtenu étant confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ), pic caractéristique à 149 ppm du phosphoramidite.

15. Procédé, suivant l'une quelconque des revendications 13 et 14, caractérisé en ce que la synthèse de l'oligonucléotide ATTG\*AATG\*TTT, contenant deux C<sub>2</sub>-spermine guanosines, est faite sur un synthétiseur automatique, avec utilisation d'un programme de couplage standard pour une synthèse de 1  $\mu\text{mol}$  (avec un excès de 20 équivalents du phosphoroamidite de la base modifiée), seul le sous-programme pour la déprotection du groupement trityl étant modifié : le temps de réaction étant augmenté de 8 à 20 s et un cycle supplémentaire étant rajouté, le dernier groupement trityl étant conservé pour faciliter la purification de l'oligonucléotide par HPLC sur une colonne de silice C18 inverse.

16. Procédé, suivant l'une quelconque des revendications 13 et 15, caractérisé en ce que pour l'incorporation de la spermine, la déprotection et la purification de l'oligonucléotide, la résine (15 mg) contenant l'oligonucléotide est mise dans 300  $\mu\text{l}$  d'une solution de spermine (1 M) dans le méthanol pendant 3 jours à 55°C, l'oligonucléotide est ensuite purifié par HPLC sur une colonne Millipore Nova Pak avec un gradient croissant en acétonitrile (de 5 % à 40 % en 40 minutes) dans du tampon acétate de triéthylammonium 100 mM pH 6,5, le temps de rétention étant de 27 minutes, ensuite, pour déprotéger le groupement p nitrophényléthyl, l'oligonucléotide purifié est mis dans 500  $\mu\text{l}$  de DBU 0,5 M dans la pyridine pendant 24 heures à 55°C, une extraction chloroforme/eau permet, ensuite, de récupérer l'oligonucléotide dans la phase aqueuse qui est évaporée, puis reprise dans l'acide acétique à 80 % pour déprotéger le groupement 5'-trityl, l'oligonucléotide modifié complètement déprotégé est de nouveau purifié par HPLC (même colonne et gradient que précédemment, temps de rétention de 13 minutes), la structure de l'oligonucléotide étant confirmée par la spectroscopie de masse en électro spray négatif qui donne une masse de  $3727 \pm 3$ .

17. Utilisation des bases suivant l'une quelconque des revendications 1 à 16 pour la reconnaissance d'une séquence-cible d'ADN par synthèse d'un oligomère de séquence complémentaire à celle de l'un des deux brins de la séquence concernée.

18. Utilisation des bases suivant l'une quelconque des revendications 1 à 16 pour la reconnaissance de séquence par formation d'hélices triples selon la technique dite "antigène".

- 25 -

19. Utilisation des bases suivant l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour la reconnaissance de séquences d'ARN messenger par la technique dite "antisens".

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/00542

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07H21/00 C07H19/04 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07H C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PROGRESS IN BIOPHYSICS AND MOLECULAR BIOLOGY, vol.47, 1986, GB pages 31 - 112 C.ZIMMER ET AL. 'Nonintercalating DNA-Binding Ligands and their Use as Tools in Biophysical and Biological Investigations of the Genetic Material.' cited in the application see the whole document	1
A	BIOPOLYMERS, vol.21, 1982 pages 1301 - 1314 W.H.BRAUNLIN ET AL. 'Equilibrium Dialysis Studies of Polyamine Binding to DNA.' cited in the application see abstract	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 July 1995

Date of mailing of the international search report

18.07.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Authorized officer

Scott, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 95/00542

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH., vol.18, 1990, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 89 - 95 A.GARCIA ET AL. 'New Photoactivatable Structural and Affinity Probes of RNAs: Specific Features and Applications for Mapping of Spermine Binding Sites in Yeast tRNA and the Interaction of this tRNA with Yeast Aspartyl-tRNA Synthetase.' cited in the application see abstract ---</p>	1
A	<p>BIOCHEMISTRY., vol.30, 1991, EASTON, PA US pages 4357 - 4361 N.SCHMID ET AL. 'Location of Spermine and Other Polyamines on DNA As Revealed by Photoaffinity Cleavage with Polyaminobenzenediazonium Salts.' cited in the application see the whole document -----</p>	1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. le Internationale No  
PCT/FR 95/00542

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C07H21/00 C07H19/04 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07H C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PROGRESS IN BIOPHYSICS AND MOLECULAR BIOLOGY, vol.47, 1986, GB pages 31 - 112 C.ZIMMER ET AL. 'Nonintercalating DNA-Binding Ligands and their Use as Tools in Biophysical and Biological Investigations of the Genetic Material.' cité dans la demande voir le document en entier ---	1
A	BIOPOLYMERS, vol.21, 1982 pages 1301 - 1314 W.H.BRAUNLIN ET AL. 'Equilibrium Dialysis Studies of Polyamine Binding to DNA.' cité dans la demande voir abrégé ---	1

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 Juillet 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18.07.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.

Fonctionnaire autorisé

Scott, J

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der le Internationale No

PCT/FR 95/00542

## C.(rule) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH., vol.18, 1990, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 89 - 95 A.GARCIA ET AL. 'New Photoactivatable Structural and Affinity Probes of RNAs: Specific Features and Applications for Mapping of Spermine Binding Sites in Yeast tRNA and the Interaction of this tRNA with Yeast Aspartyl-tRNA Synthetase.' cité dans la demande voir abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
A	<p>BIOCHEMISTRY., vol.30, 1991, EASTON, PA US pages 4357 - 4361 N.SCHMID ET AL. 'Location of Spermine and Other Polyamines on DNA As Revealed by Photoaffinity Cleavage with Polyaminobenzenediazonium Salts.' cité dans la demande voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1